

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**



Generate Collection

L14: Entry 357 of 590

File: DWPI

May 10, 1996

DERWENT-ACC-NO: 1997-050313

DERWENT-WEEK: 199705

COPYRIGHT 2003 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Phage prepn. streptofagin prodn. - using new strains of virulent mutants of mild bacteriophages VKPM RN-715, 716 and 717 propagated in Streptococcus bovis indicator cultures

INVENTOR: TARAKANOV, B V

PRIORITY-DATA: 1993RU-0027548 (May 20, 1993)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
RU 2059723 C1	May 10, 1996		008	C12N007/00

INT-CL (IPC): C12 N 7/00

ABSTRACTED-PUB-NO: RU 2059723C

BASIC-ABSTRACT:

Prodn. of a phage prepn. streptofagin (SF) involves culturing streptococcal strains sensitive to bacteriophages at 38-39 deg. C in a nutrient medium contg. sources of nitrogen, amino acid, carbohydrates mineral salts and water, infection of the culture with Streptococcus bovis VM 28/28, infectivity 0.1-1.0, and their lysis to the max. clarification of the phage lysate. New strains of virulent mutants of mild bacteriophages VKPM RN-715, VKPM RN-716, and VKPM RN-717 are also used. These are propagated in Streptococcus bovis BT6, BT6, and BT-54 indicator cultures, correspondingly grown in nutrient media contg. as a carbohydrate source wood waste hydrolysate, and as simultaneous amino acid, nitrogen, and vitamin sources a fodder yeast autolysate (FYA), contg. (g/l): 10-25 wood waste hydrolysate, 10-25 FYA, 5-11 sodium bicarbonate, and 1 l distilled water. Daily indicator cultures are added to the nutrient medium, in quantity 2.5-5% of the medium vol., and when the culture attains an optical density of 0.55-0.91 units, it is infected with bacteriophage, and incubation is continued until lysis sets in, accompanied by a decrease in optical density to 0.03-0.08 units. The phage lysates are filtered through sterilising filters of pore dia. 0.2  $\mu$ , and the prod. is tested for sterility, bottled, labelled and stored at 4-6 deg. C.

In obtaining the dry SF prepn., corn flour, barley siftings, and ammonium sulphate are added to the phage lysate devoid of viable indicator culture cells in 1:1.1:2 and 3:10 ratio respectively, the mixt. is carefully mixed, freeze-dried to 8-10% moisture, and stored at 4-6 deg. C before use.

USE - The method is useful in animal husbandry.

ADVANTAGES - The method gives an increased prod. yield, can be used to obtain both dry and liq. forms of SF, and a simpler and cheaper nutrient medium can be used.

ABSTRACTED-PUB-NO: RU 2059723C  
EQUIVALENT-ABSTRACTS:

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0



(19) RU<sup>(11)</sup> 2 059 723<sup>(13)</sup> C1  
 (51) МПК<sup>6</sup> C 12 N 7/00

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
 ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 93027548/13, 20.05.1993

(46) Дата публикации: 10.05.1996

(56) Ссылки: Соколов Ю.А. Труды ВНИИФБиП с.-х. жив., 1980, т. XXII, с. 3 - 12. Авторское свидетельство СССР N 1778180, кл. C 12N 1/20, опублик. 1992.

(71) Заявитель:  
 Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных,  
 Тараканов Борис Васильевич

(72) Изобретатель: Тараканов Б.В.

(73) Патентообладатель:  
 Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных,  
 Тараканов Борис Васильевич

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФАГОВОГО ПРЕПАРАТА "СТРЕПТОФАГИН"

(57) Реферат:

Использование: биотехнология. Сущность изобретения: для приготовления препарата "Стрептофагин" предлагается использовать 4 вирулентных мутанта умеренных фагов Streptococcus bovis BM 6/6, BM 32/6, BM 28/28 и BM 54/54, размножение которых проводят на индикаторных культурах Streptococcus bovis БТ -6, БТ -28 и БТ -54 соответственно. Культуры выращивают на среде, имеющей следующий состав, г/л: гидролизат древесных отходов 10-25, автолизат кормовых дрожжей 10-25, двууглекислый натрий 5-11 и дистиллированная вода 1л. Чувствительные культуры инкубируют при 38-39°C и при

достижении ими оптической плотности 0,55-0,91 ед. инфицируют фагами с множественностью инфекции 0,1-1 и продолжают культивирование до наступления лизиса. Нативный фаголизат фильтруют через фильтры с диаметром пор не более 0,2 мкм и стерильные фаголизаты фасуют по флаконам (жидкая форма) или используют для получения сухого препарата. В качестве наполнителей применяют кукурузную муку, ячменные отруби и сульфат аммония при массовых соотношениях 1-3:1-10 (наполнитель/фаг). Жидкая и сухая формы стрептофагина могут храниться при + 4-6°C до 29 и 15 мес соответственно, 1 з. п. ф-лы, 8 табл.

RU 2 059 723 C1

RU 2 059 723 C1



RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) RU<sup>(11)</sup> 2 059 723<sup>(13)</sup> C1  
(51) Int. Cl.<sup>6</sup> C 12 N 7/00

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 93027548/13, 20.05.1993

(46) Date of publication: 10.05.1996

(71) Applicant:  
Vserossiiskij nauchno-issledovatel'skij  
institut fiziologii, biokhimii i pitanija  
sel'skokhozjajstvennykh zhivotnykh,  
Tarakanov Boris Vasil'evich

(72) Inventor: Tarakanov B.V.

(73) Proprietor:  
Vserossiiskij nauchno-issledovatel'skij  
institut fiziologii, biokhimii i pitanija  
sel'skokhozjajstvennykh zhivotnykh,  
Tarakanov Boris Vasil'evich

## (54) METHOD OF PHAGE PREPARATION PREPARING

(57) Abstract.

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE: method involves the use of 4 virulent temperate phages of Streptococcus bovis BM 6/6, BM 32/6, BM 28/28 and BM 54/54 which were multiplied on indicator cultures Streptococcus bovis BT-6, BT-6, BT-28 and BT-54, respectively. Cultures were grown on the medium of the following composition, g/l: wood waste hydrolysate 10-25; food yeast autolysate 10-25; sodium hydrocarbonate 5-11, and distilled water 1 l. Sensitive cultures were incubated at 38-39 C and at optical density value 0.55-0.91 u, infected with phages (infection

multiple index is 0.1-1) followed cultivation up to lysis onset. Native phagolysates were filtered through filters (pore diameter is 0.2 mm, not more) and sterile phagolysates were packaged into bottles (liquid form) or used for dry preparation preparing. Corn flour, barley bran and ammonium sulfate were used as fillers at the mass ratio = (1-3); (1-10) (filler/phage). Liquid and dry forms of streptocophagin prepared can be stored at +4-6 C for 29 and 15 months, respectively. EFFECT: improved method of phage preparation preparing. 2 cl, 6 tbl

RU 2 059 723 C1

RU 2 059 723 C1

Изобретение относится к биотехнологии и касается производства нового биопрепарата стрептофагина для животноводства.

Известен способ приготовления бактериофагов *Streptococcus bovis* (стрептофагин), включающий культивирование чувствительных к бактериофагам штаммов стрептококков до экспоненциальной фазы роста (3-5 ч) на питательной среде, содержащей пептон, гидролизат казеина, цистеин солянокислый и сульфат аммония в качестве источников азота и аминокислот, глюкозу и мальтозу в качестве источников энергии и углерода, набор минеральных солей и воду, инфицирование культур фагом *Str.bovis* с множественностью инфекции 0,1-1,0 и последующее их инкубирование при 39-39°C в течение 4-5 ч до максимального просветления фаголизата. Выход фага, получаемого по этому способу, варьирует в пределах  $10^8$  -  $10^{10}$  частиц/мл.

Недостатком этого способа является сложный состав и высокая стоимость питательной среды, используемой для получения бактериофага, а также отсутствие способа приготовления кормовых форм препарата стрептофагина для использования в животноводстве.

Целью изобретения является получение новых штаммов вирулентных мутантов умеренных бактериофагов *Str.bovis*, пригодных для приготовления жидкой и сухой форм стрептофагина, удешевление питательной среды для их размножения и повышения выхода целевого продукта.

Указанная цель достигается тем, что при получении нового биопрепарата стрептофагина используют 4 спонтанных вирулентных мутанта умеренных фагов *Str.bovis* BM 6/6, BM 32/6, BM 28/28 и BM 54/64, которые размножают на индикаторных культурах *Str.bovis* БТ-6, БТ-6, БТ-28 и БТ-54 соответственно, выращиваемых в биологически полноценной питательной среде, обеспечивающей повышение выхода бактериофагов в 1-16 раз и многократное (в 75 раз) снижение затрат на компоненты питательной среды.

Технология получения жидкой и сухой форм препаратов бактериофагов (стрептофагина) сводится к получению в реакторе жидкого фаголизата, его фильтрации через стерилизующие фильтры с диаметром пор 0,2 мкм и фасовки по флаконам, в случае жидкого препарата, или смешивания стерильного фаголизата с наполнителями, предпочтительно с кукурузной мукой или ячменными отрубями, и лиофильного высушивания до влажности 6-10% в случае сухого препарата.

Пример 1. Используемые для приготовления стрептофагина штаммы бактериофагов *Str.bovis* имеют следующие свойства.

Штамм бактериофага *Str.bovis* BM 6/6 (ВКПМ РН-715)

1. Происхождение. Вирулентный мутант умеренного фага *Str.bovis* BM 6/6 выделен из спонтанно лизировавшейся лизогенной культуры *Str.bovis* БТ-6.

2. Морфология негативных колоний (бляшек). Фаг *Str.bovis* BM 6/6 на газоне индикаторного штамма *Str.bovis* БТ-6/8 образует округлые с достаточно четким краем негативные колонии от 0,5 до 1,5 мм в

диаметра.

3. Вирулентность. Фаг BM 6/6 лизирует культуры *Str.bovis* БТ-6, БТ-28 и БТ-54.

4. Скорость и степень адсорбции. При множественности инфекции равной 0,02 и инкубации адсорбционной смеси при 39°C за 5 мин адсорбируется 88,8% фага.

5. Латентный период и урожай фага. Латентный период более 20 мин и менее 25 мин ( $\approx 22,5$  мин). Нарастание титра фагов происходит с 25 по 35 мин. Средний урожай фага составляет 63 фаговых частицы на одну клетку.

6. Титр фага в нативном фаголизате варьирует в пределах  $3,93 \pm 1,1 \times 10^{10}$ , а остаточное количество нелизировавшихся жизнеспособных клеток индикаторного штамма  $2,43 \pm 0,47 \times 10^6$ .

Штамм бактериофага *Str.bovis* BM 32/6 (ВКПМ РН-716).

1. Происхождение. Вирулентный мутант умеренного фага *Str.bovis* BM 32/6 выделен из спонтанно лизировавшейся лизогенной культуры *Str.bovis* БТ-32.

2. Морфология негативных колоний. Фаг *Str.bovis* BM 32/6 на газоне индикаторного штамма *Str.bovis* БТ-6 образует округлые с достаточно четким краем негативные колонии от 0,5 до 1,5 мм в диаметре.

3. Вирулентность. Вирулентен для культур *Str.bovis* БТ-6, БТ-28, БТ-54.

4. Скорость и степень адсорбции. При множественности инфекции равной 2,24 и инкубации адсорбционной смеси при температуре 39°C за 5 мин адсорбируется 99,5% фага.

5. Латентный период и урожай фага. Латентный период более 20 мин и менее 25 мин ( $\approx 22,5$  мин). Нарастание титра фагов происходит с 25 до 35 мин. Средний урожай фага составляет 73 фаговых частицы на одну клетку.

6. Титр фага в нативном фаголизате варьирует в пределах  $6,22 \pm 0,82 \times 10^{10}$ , а остаточное количество нелизировавшихся жизнеспособных клеток индикаторного штамма находится на уровне  $3,4 \pm 0,61 \times 10^7$ .

Штамм бактериофага *Str.bovis* BM 28/28 (ВКПМ РН-689)

1. Происхождение. Вирулентный мутант умеренного фага *Str.bovis* BM 28/28 выделен из спонтанно лизировавшейся лизогенной культуры *Str.bovis* БТ-28.

2. Морфология негативных колоний. Фаг BM 28/28 на газоне индикаторного штамма *Str.bovis* БТ-28 образует округлые с достаточно четким краем негативные колонии от 0,5 до 2 мм в диаметре.

3. Вирулентность. Из 93 исследованных культур *Str.bovis*, выделенных из рубца овец и коров, 19 оказались чувствительны к данному фагу. Этот фаг лизирует также культуры *Str.bovis* БТ-6 и БТ-54.

4. Скорость и степень адсорбции. При множественности инфекции равной 0,03 и инкубации адсорбционной смеси при 39°C за 5 мин адсорбируется 98,8% фага.

5. Латентный период и урожай фага. Латентный период более 25 мин и менее 30 мин ( $\approx 27,5$  мин). Нарастание титра фагов происходит с 30 по 40 мин. Средний урожай фага составляет 40 фаговых частиц на одну клетку.

6. Титр фага в нативном фаголизате

варьирует в пределах  $11,25 \pm 1,31 \times 10^{10}$ , а остаточное количество нелизировавшихся жизнеспособных клеток индикаторного штамма  $2,33 \pm 0,32 \times 10^6$ .

Штамм бактериофага *Str.bovis* BM 54/54 (ВКПМ РН-717).

1. Происхождение. Вирулентный мутант умеренного фага *Str.bovis* BM 54/54 выделен из спонтанно лизировавшейся лизогенной культуры *Str.bovis* БТ-54.

2. Морфология негативных колоний. Фаг *Str.bovis* BM 54/54 на газоне индикаторного штамма *Str.bovis* БТ-54 образует округлые с ровным четким краем негативные колонии от 0,5 до 1,5-1,7 мм в диаметре.

3. Вирулентность. Фаг BM 54/54 лизирует культуры *Str.bovis* БТ-8, БТ-28 и БТ-54.

4. Скорость и степень адсорбции. При множественности инфекции равной 0,5 и инкубации адсорбционной смеси при 39°C за 5 мин адсорбируется 99,6% фага.

5. Латентный период и урожай фага. Латентный период более 20 мин и менее 25 мин ( $\approx 22,5$  мин). Нарастание титра фага происходит с 25 по 35 мин. Средний урожай фага составляет 74 фаговых частицы на одну клетку.

6. Титр фага в нативном фаголизате варьирует в пределах  $9,57 \pm 2,82 \times 10^{10}$ , а остаточное количество нелизировавшихся жизнеспособных клеток индикаторного штамма не превышает  $0,7 \pm 0,19 \times 10^6$ .

Пример 2. Выход фагов при размножении в известной и предлагаемой средах.

Берут известную питательную среду по прототипу и предлагаемую, которую готовят по следующим 4 рецептам (табл. 1.).

Рекомендуемые для среды компоненты изготавливаются в промышленном масштабе из пищевого сырья, сравнительно недороги и могут быть введены в состав питательной среды без дополнительной обработки.

Гидролизат древесных отходов в абсолютно сухом веществе содержит (в) гексах 45,7-68,2; пентоз 11,9-39,2; сахаристого остатка 5-10,8; золы 4,8-6,1; сырого протеина 1,2-1,5; сырого жира 0,5-1,1 и лигнина 2.

Автолизат кормовых дрожжей (паприна) представляет собой светло-желтый порошок, в абсолютно сухом веществе которого содержится (в) сырого протеина 61-64; растворимого белка 16,25-20,7; аминокислот азота 4,5-7,9; растворимых нуклеотидов не более 2,5; общих углеводов не более 2; липидов не более 16 и золы 9,2-9,7. Паприна содержит следующие витамины, мг/кг сухого вещества: тиамин 4, рибофлавин 180, пиридоксин 25, ниацин 430, пантотеновая кислота 125, фолиевая кислота 8, аминокислотная кислота 40, холин 8300 и инозитол 3265.

Предлагаемая питательная среда полностью удовлетворяет потребности индикаторных штаммов в элементах питания, факторах роста и лизиса, что позволяет повысить выход фагов на единицу использованной среды.

Питательную среду готовят следующим образом. Необходимые на 1 л среды навески компонентов вносят в литровую колбу, добавляют воду, тщательно перемешивают и фильтруют через вату. Затем доводят объем

среды до 1 л и устанавливают pH в пределах 7-7,2. Приготовленный бульон разливают в пробирки по 10 мл, закрывают резиновыми пробками и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. 30 мин.

Сравнительную оценку выхода фага при лизисе культур ведут на предлагаемой и известной средах. Для этого используют 4 вирулентных мутанта умеренных фагов *Str.bovis* BM 6/6, BM 32/6, BM 28/28 и BM 54/54, которые размножают на соответствующих индикаторных культурах. В пробирки с 10 мл среды вносят по 0,5 мл суточной индикаторной культуры и инкубируют при 38-39°C. Спустя 3-5 ч в начале экспоненциальной фазы роста, культуры инфицируют фагами в дозе 0,1 мл и продолжают культивирование еще 4-5 ч до наступления лизиса культуры, который наблюдается визуально. Готовые нативные (наочищенные) фаголизаты до титрования хранят в холодильнике при 4°C.

Титрование осуществляют методом агаровых слоев. Для нижнего слоя используют среду следующего состава, г/л:  $K_2HPO_4$  0,5;  $KH_2PO_4$  0,2;  $(NH_4)_2SO_4$  0,5; NaCl 1,0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1;  $CaCl_2$  0,1;  $NaHCO_3$  5,0; глюкоза 5,0; мальтоза 3,0, пептон 10,0; гидролизат казеина 5,0; цистеин солянокислый 0,7; агар-агар 15,0. В качестве верхнего слоя применяют 0,7%-ный мясокислотный агар, содержащий по 0,5% глюкозы и мальтозы и 0,1% танина 80.

Разведения фаголизатов готовят на 0,85%-ном растворе хлорида натрия до  $10^{-9}$ , а посев проводят следующим образом. В пробирку с расплавленной и остуженной до 48-50°C средой для верхнего слоя (3 мл) вносят 0,5 мл 4-5 часовой индикаторной культуры и перемешивают. На поверхность нижнего слоя наносят 0,5 мл разведения фаголизата, выливают из пробирки среду для верхнего слоя с индикаторной культурой и, поставив чашку в горизонтальной плоскости, тщательно перемешивают. Спустя 1 ч после посева и затвердения верхнего слоя чашки инкубируют 18-20 ч при 38-39°C, а затем проводят подсчет негативных колоний (бляшек).

Результаты исследований представлены в табл. 2.

Из представленных в табл. 2 результатов видно, что использование предлагаемой среды в сравнении с известной повышает выход фагов: BM 6/6 в 3,9-11,5 раза; BM 32/6 в 1,3-16,8 раза; BM 28/28 в 4,4 7,4 раза; и BM 54/54 в 2,4 6,3 раза.

Пример 3. При промышленном получении бактериофагов *Str.bovis* их размножение проводят в реакторе на соответствующих индикаторных культурах. В реактор к стерильной среде добавляют 2,5-5% по объему суточной бульонной индикаторной культуры, перемешивают и инкубируют культуры при 38-39°C. После 3-4 часового культивирования в экспоненциальной фазе роста, когда оптическая плотность культуральной суспензии достигнет 0,55-0,91 ад. оптической плотности, в реактор вносят бактериофаг из расчета 1 инфекционная фаговая частица на 1-10 бактериальных клеток. Латентный внутриклеточный период размножения фагов составляет 35-40 мин. Через 5-6 генераций

фага, длящихся 3,5- 4 ч, наступает видимый лизис бактериальных клеток, сопровождающийся просветлением культуральной среды до оптической плотности 0,03-0,08 ед.

Получаемые таким образом нативные фаголизаты, имеющие титр фагов порядка  $3,93 \cdot 10^{10}$  и остаточные количества жизнеспособных фагостойчивых клеток в пределах  $0,7 \cdot 10^6$  -  $3,4 \cdot 10^7$  мл (табл. 3), непосредственно из реактора фильтруют через стерилизующие фильтры с диаметром пор не более 0,2 мкм. Затем после проведения контроля на стерильность фаголизаты фасуют по флаконам, герметически укупоривают, этикетируют и хранят при +4-6 °С до применения. Эту жидкую форму препарата стрептофагина используют непосредственно для скормливания животным.

**Пример 4.** Сухую форму стрептофагина получают путем лиофильного высушивания стерильного фаголизата вместе с различными наполнителями.

Берут бактериофаги Str.bovis BM 6/6, BM 32/6, BM 28/28 и BM 54/54 и смешивают их с комбикормом или кукурузной мукой в соотношении 1:1 по массе, с ячменными отрубями в соотношении 2:1 и сульфатом аммония 10:3 (фаг/наполнитель), замораживают в морозильной камере при -20-45°С и высушивают под вакуумом до влажности 8-10%.

Определение титра фагов в сухих препаратах, проведенное аналогично примеру 2, показало, что бактериофаги BM 6/6, BM 32/6, BM 28/28 и BM 54/54 имеют неодинаковую устойчивость к высушиванию. Так, фаг BM 6/6 при лиофилизации со всеми испытанными наполнителями проявлял минимальную выживаемость (11,4-20,7%), фаг BM 32/6 максимальную (38,4-77,6%), а фаги BM 28/28 и BM 54/54 занимали промежуточное положение (табл. 4). Кроме индивидуальной чувствительности фагов на их сохранность в сухих препаратах отчетливое действие оказывают наполнители. Минимальная выживаемость всех фагов наблюдалась при использовании в качестве наполнителя комбикорма, имеющего следующий состав, кукуруза 49,7; рожь 20; отруби 15; шрот соевый 10; травяная мука 2; фосфат 2; соль поваренная 0,3 и премикс Л51-71. При применении кукурузной муки заметно возрастала сохранность фагов BM 6/6, BM 32/6 и BM 54/54, тогда как для фага BM 28/28 она существенно не изменялась. Сохранность бактериофага BM 32/6 в этом наполнителе была максимальной и достигала 77,6%. У фагов BM 28/28 и BM 54/54 максимальная выживаемость (39,6-46,7%) достигалась при высушивании с ячменными отрубями. Сульфат аммония обеспечивал высокую сохранность (43,9-50,2%) фагов BM 32/6 и BM 28/28 и низкую фага BM 54/54.

**Пример 5.** Оценку активности фаговых частиц в жидкой и сухих формах стрептофагина в связи с продолжительностью и температурой хранения препаратов проводили по методу агаровых слоев аналогично примеру 2.

Сравнительные исследования жидкого препарата показали, что хранение его в холодильнике при +4-6°С обеспечивает

высокую инфекционную активность фаговых частиц в течение 29 мес, тогда как выдерживание препарата при комнатной температуре +18-22°С сопровождается полной потерей активности фаговых частиц уже после 8-месячного хранения (табл. 5).

Титрование сухих препаратов, изготовленных на основе комбикорма, кукурузной муки и ячменных отрубей показало, что их хранение при +4-6°С гарантирует высокую активность фагов (исключение BM 28/28 с комбикормом) в течение 15 мес (табл. 6). Экспозиция препаратов при +18-22°С сопровождается более высокой степенью инактивации фагов, но тем не менее в течение 3-месячного периода хранения большинство препаратов сохраняет титр инфекционных фаговых частиц, достаточный для обеспечения положительного действия на продуктивность животных при скормливании препарата в рекомендуемой дозе 25 г на голову в день. После 7-месячного хранения при комнатной температуре высокую активность сохраняли фаги BM 6/6 и BM 32/6, тогда как титр фагов BM 28/28 и BM 54/54 снижился на 1-3 порядка. Учитывая тот факт, что минимальная эффективная доза активных фаговых частиц составляет  $3,5 \cdot 10^8$  частиц/голову в день, препараты с титром фага ниже  $1,4 \cdot 10^9$ /г могут быть использованы в кормлении животных, но только после корректировки суточной дозы, исходя из фактической концентрации активных фаговых частиц.

Что касается препаратов фагов, содержащих в качестве наполнителя сульфат аммония, то высокая их активность сохранялась при +4-6°С и +18-22°С только в течение трех месяцев. При дальнейшем хранении препаратов титр фагов в них снижался в сравнении с исходным на 2-3 порядка. Использовать в кормлении коров препарат стрептофагина на основе сульфата аммония с титром фагов ниже  $3,5 \cdot 10^7$  частиц/г не представляется возможным, поскольку в этом случае появляется риск непосредственного токсического действия сульфата аммония на организм животных.

Изготавливаемые по предлагаемой технологии жидкая и сухая формы стрептофагина имеют следующие характеристики.

Жидкий препарат представляет собой жидкость от соломенно-желтого до светло-коричневого цвета, без специфического запаха, содержащую 2-3% сухого вещества. Сухой препарат представляет собой мелкодисперсный порошок от белого до темно-серого или желтовато-бежего цвета, в зависимости от цвета использованного наполнителя, без специфического запаха с массовой долей влаги 8-10%. Титр активных фаговых частиц в 1 мл жидкого или 1 г сухого препарата находится в пределах  $1-5 \cdot 10^8$ . Число посторонних микробных клеток в 1 мл жидкого или 1 г сухого препарата не превышает  $150 \cdot 10^3$ , а наличие патогенной микрофлоры не допускается.

Препарат стрептофагин предназначен для скормливания высокопродуктивным лактирующим коровам, содержащимся на высококонцентрированных рационах (более 40%

RU 2 0 5 9 7 2 3 C 1

RU 2 0 5 9 7 2 3 C 1



концентратов по питательности), в качестве средства регуляции микробиологических и метаболических процессов в рубке, обеспечивающего повышение жирности молока и эффективности использования корма.

#### Формула изобретения:

1. СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФАГОВОГО ПРЕПАРАТА "СТРЕПТОФАГИН", предусматривающий культивирование при 38-39°C чувствительных к бактериофагам штаммов стрептококков на питательной среде, содержащий источники азота, аминокислот, углеводы, минеральные соли и воду, инфицирование культур фагом *Streptococcus bovis* BM 28/28 с множественностью заражения 0,1 1,0 и их лизис до максимального просветления фаголизата, отличающийся тем, что дополнительно используют новые штаммы вирулентных мутантов умеренных бактериофагов ВКПМ РН-715, ВКПМ РН-716 и ВКПМ РН-717, которые размножают на индикаторных культурах *Str.bovis* БТ6, БТ6 и БТ-54, соответственно выращиваемых на питательной среде, содержащей в качестве источника углеводов гидролизат древесных отходов, а в качестве одновременного источника азота, аминокислот и витаминов

автолизат кормовых дрожжей при следующем соотношении компонентов, г/л:

Гидролизат древесных отходов 10 25

Автолизат кормовых дрожжей 10 25

Двууглекислый натрий 5 11

Дистиллированная вода, л 1

причем в питательную среду суточные индикаторные культуры добавляют из расчета 2,5-5% к объему среды и по достижении культурой оптической плотности 0,55-0,91 ед. ее инфицируют бактериофагом и продолжают инкубацию до наступления лизиса, сопровождающегося снижением оптической плотности до 0,03-0,08 ед. полученные фаголизаты фильтруют через стерилизующие фильтры с диаметром пор 0,2 мкм, проверяют на стерильность, фасуют, укупоривают, этикетировать и хранят при 4-6°C.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что при получении сухого препарата стрептофагина к свободному от жизнеспособных клеток индикаторной культуры фаголизату добавляют кукурузную муку, ячменные отруби, сульфат аммония в массовых соотношениях 1:1, 1:2 и 3:10 соответственно, тщательно перемешивают, лиофильно высушивают до влажности 8-10% и хранят при температуре 4-6°C до применения.

RU 2 0 5 9 7 2 3 C 1

RU 2 0 5 9 7 2 3 C 1

Таблица 1

## Рецепты предлагаемой среды

Номер среды	Компоненты среды, г/л		
	Гидролизат древес- ных отходов	Автолизат кормовых дрожжей	Диууглекислый на- трий
1	10	10	5
2	15	15	7
3	20	20	9
4	25	25	11

RU 2059723 C1

RU 2059723 C1

Таблица 2

Титр фагов, приготовленных в известной и предлагаемой средах

Питательные среды	Номера фагов			
	ВМ 6/6	ВМ 32/6	ВМ 28/28	ВМ 54/54
Известная	$5,07 \cdot 10^9$	$6,55 \cdot 10^9$	$1,35 \cdot 10^{10}$	$7,12 \cdot 10^{10}$
Предлагаемая				
1	$1,96 \cdot 10^{10}$	$0,85 \cdot 10^{10}$	$6,0 \cdot 10^{10}$	$1,69 \cdot 10^{10}$
2	$5,44 \cdot 10^{10}$	$3,72 \cdot 10^{10}$	$7,79 \cdot 10^{10}$	$4,50 \cdot 10^{10}$
3	$5,58 \cdot 10^{10}$	$4,17 \cdot 10^{10}$	$1,00 \cdot 10^{11}$	$4,44 \cdot 10^{10}$
4	$5,82 \cdot 10^{10}$	$1,10 \cdot 10^{10}$	$9,0 \cdot 10^{10}$	$3,22 \cdot 10^{10}$

Таблица 3

Оптическая плотность культур, титр фагов и остаточное количество жизнеспособных клеток в процессе приготовления фаголизатов

Показатели	Номера фагов			
	ВМ 6/6	ВМ 32/6	ВМ 28/28	ВМ 54/54
Оптическая плотность культур (Ед. ОП) в возрасте, ч:				
4	$0,55 \pm 0,012$	$0,56 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,02$	$0,91 \pm 0,003$
4,5	$0,63 \pm 0,027$	$0,67 \pm 0,005$	$0,89 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,02$
5	$0,53 \pm 0,012$	$0,53 \pm 0,007$	$0,87 \pm 0,03$	$1,02 \pm 0,04$
5,5	$0,25 \pm 0,017$	$0,21 \pm 0,007$	$0,36 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,04$
6	$0,17 \pm 0,007$	$0,14 \pm 0,007$	$0,096 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,03$
6,5	$0,11 \pm 0,010$	$0,10 \pm 0,006$	$0,038 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$
7	$0,09 \pm 0,009$	$0,08 \pm 0,007$	$0,037 \pm 0,005$	$0,08 \pm 0,003$
7,5	-	-	$0,033 \pm 0,006$	$0,06 \pm 0,004$
8	$0,08 \pm 0,006$	$0,07 \pm 0,008$	$0,028 \pm 0,006$	$0,06 \pm 0,005$
Титр фагов, $\times 10^{10}$	$3,93 \pm 31,1$	$6,22 \pm 0,82$	$11,25 \pm 1,31$	$9,57 \pm 2,82$
Остаточное количество жизнеспособных клеток бактерий в фаголизаторах	$2,43 \pm 0,47$ $\times 10^6$	$3,4 \pm 0,61$ $\times 10^7$	$2,33 \pm 0,32$ $\times 10^6$	$0,7 \pm 0,19$ $\times 10^6$

Примечание: "-" не определяли.

Т а б л и ц а 4

Выживаемость бактериофагов при высушивании с разными наполнителями

Наполнители	Номера фагов	Теоретически возможное количество фаговых частиц в 1 г препарата, $\times 10^9$	Фактическое содержание фаговых частиц в 1 г препарата, $\times 10^9$	Выживаемость, %
Комбикорм	ВМ 6/6	18,8	2,14	11,4
	Вм 32/6	9,9	3,80	38,4
	Вм 28/28	9,5	1,57	16,5
	Вм 54/54	14,2	3,41	24,0
Кукурузная мука	ВМ 6/6	18,8	3,90	20,7
	Вм 32/6	9,9	7,68	77,6
	Вм 28/28	9,5	1,42	14,9
	Вм 54/54	14,2	4,68	33,0
Ячменные отруби	ВМ 6/6	37,6	5,93	15,8
	Вм 32/6	19,8	11,60	58,6
	Вм 28/28	19,0	8,87	46,7
	Вм 54/54	28,4	11,24	39,6
Сульфат аммония	ВМ 32/6	33,0	14,50	43,9
	Вм 28/28	31,7	15,90	50,2
	Вм 54/54	47,3	4,84	10,2

Т а б л и ц а 5

Динамика инактивации бактериофагов в жидких препаратах стрептофагина, сохраняемых при разных температурах

Показатель	Температура хранения, °C	Номер фагов		
		ВМ 6/6	ВМ 28/28	ВМ 54/54
Титр фагов, частиц/мл:				
при изготовлении		$26,9 \cdot 10^9$	$15,0 \cdot 10^9$	$32,5 \cdot 10^9$
после 8-месячного хранения	+4+6	$13,9 \cdot 10^9$	$10,5 \cdot 10^9$	$26,6 \cdot 10^9$
	+18+22	0	0	0
после 13-месячного хранения	+4+6	$5,11 \cdot 10^9$	$2,11 \cdot 10^9$	$14,9 \cdot 10^9$
после 29-месячного хранения	+4+6	$6,14 \cdot 10^9$	$1,13 \cdot 10^9$	$8,31 \cdot 10^9$

10 8246902 RU

Таблица 6

Динамика инaktivации бактериофагов в сухих препаратах стрептофагина, сохраняемых при разных температурах

Наполнитель	Номера фагов	Исходный титр фагов ча- стиц/мл	Температура и продолжительность хранения, мес					
			+18-22°C			+4-6°C		
			3	7	15	3	7	15
Комбикорм	ВМ 6/6	$2,14 \cdot 10^9$	$1,12 \cdot 10^9$	$5,64 \cdot 10^8$	$1,69 \cdot 10^8$	$2,82 \cdot 10^9$	$2,73 \cdot 10^9$	$6,31 \cdot 10^8$
	ВМ 32/6	$3,80 \cdot 10^9$	$2,40 \cdot 10^8$	$1,59 \cdot 10^8$	$2,21 \cdot 10^8$	$1,66 \cdot 10^9$	$3,84 \cdot 10^9$	$7,00 \cdot 10^8$
	ВМ 28/28	$1,57 \cdot 10^9$	$0,20 \cdot 10^8$	$2,20 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^6$	$1,56 \cdot 10^9$	$3,55 \cdot 10^8$	$4,00 \cdot 10^6$
	ВМ 54/54	$3,41 \cdot 10^8$	$1,50 \cdot 10^8$	$1,44 \cdot 10^8$	$1,40 \cdot 10^7$	$2,26 \cdot 10^9$	$1,34 \cdot 10^9$	$3,06 \cdot 10^8$
Кукурузная мука	ВМ 6/6	$3,90 \cdot 10^9$	$3,68 \cdot 10^9$	$1,48 \cdot 10^9$	$2,79 \cdot 10^8$	$2,17 \cdot 10^9$	$2,56 \cdot 10^8$	$2,90 \cdot 10^8$
	ВМ 32/6	$7,68 \cdot 10^8$	$1,31 \cdot 10^9$	$1,43 \cdot 10^8$	$2,68 \cdot 10^8$	$2,83 \cdot 10^9$	$3,76 \cdot 10^9$	$1,56 \cdot 10^9$
	ВМ 28/28	$1,42 \cdot 10^9$	$0,80 \cdot 10^8$	$0,75 \cdot 10^8$	$4,00 \cdot 10^6$	$1,62 \cdot 10^9$	$4,56 \cdot 10^8$	$4,30 \cdot 10^8$
	ВМ 54/54	$4,68 \cdot 10^9$	$3,60 \cdot 10^8$	$3,11 \cdot 10^7$	$4,00 \cdot 10^6$	$2,14 \cdot 10^9$	$2,69 \cdot 10^9$	$7,00 \cdot 10^8$
Ячменные отруби	ВМ 6/6	$5,93 \cdot 10^9$	$6,46 \cdot 10^8$	$1,66 \cdot 10^8$	$3,20 \cdot 10^7$	$7,83 \cdot 10^8$	$5,46 \cdot 10^9$	$4,73 \cdot 10^9$
	ВМ 32/6	$10,07 \cdot 10^9$	$6,32 \cdot 10^9$	$2,66 \cdot 10^9$	$1,37 \cdot 10^9$	$10,00 \cdot 10^9$	$5,91 \cdot 10^9$	$2,06 \cdot 10^9$
	ВМ 28/28	$8,87 \cdot 10^9$	$5,48 \cdot 10^8$	$2,80 \cdot 10^7$	$4,00 \cdot 10^6$	$8,50 \cdot 10^9$	$9,33 \cdot 10^9$	$2,09 \cdot 10^9$
	ВМ 54/54	$11,24 \cdot 10^9$	$1,81 \cdot 10^9$	$1,72 \cdot 10^7$	$<1,0 \cdot 10^6$	$4,80 \cdot 10^9$	$3,53 \cdot 10^9$	$6,29 \cdot 10^9$
Сульфат аммония	ВМ 32/6	$14,5 \cdot 10^9$	$0,40 \cdot 10^8$	$0,97 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^6$	$4,40 \cdot 10^9$	$3,50 \cdot 10^8$	$<1,0 \cdot 10^8$
	ВМ 28/28	$15,9 \cdot 10^9$	$2,00 \cdot 10^8$	$7,20 \cdot 10^5$	$<1,0 \cdot 10^6$	$4,68 \cdot 10^9$	-	$1,10 \cdot 10^8$
	ВМ 54/54	$4,84 \cdot 10^9$	$2,00 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^6$	$<1,0 \cdot 10^6$	$3,97 \cdot 10^9$	-	$1,94 \cdot 10^8$

Примечание: "-" не определяли

RU 2059723 C1